



# Detección de la fracción inmunotóxica del gluten en diferentes especies de cereales y su implicación en la enfermedad celíaca



Patricia García Lloret

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia





Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología

Área de Microbiología

## **Detección de la fracción inmunotóxica del gluten en diferentes especies de cereales y su implicación en la enfermedad celíaca**

Trabajo Fin de Grado experimental presentado por

**PATRICIA GARCÍA LLORET**

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de **Carolina Sousa Martín** e **Isabel María Comino Montilla**

Sevilla, septiembre de 2016



## RESUMEN

---

La enfermedad celíaca (EC) es una patología que afecta al intestino delgado proximal y está asociada a una intolerancia permanente al gluten y, frecuentemente viene acompañada de una malabsorción intestinal. El gluten se encuentra en determinados cereales como el trigo, la avena, la cebada y el centeno, y sus derivados. Cuando los pacientes con EC consumen alimentos que contienen gluten, su sistema inmune se activa dañando la mucosa del intestino delgado, produciendo la atrofia de las vellosidades del intestino. Actualmente, la única terapia que resulta efectiva para esta patología es una dieta sin gluten (DSG) durante toda la vida. Las dificultades para realizar la DSG han impulsado la investigación de alternativas terapéuticas, aunque en la actualidad ninguna de ellas es todavía una realidad práctica. Con estos antecedentes, este trabajo tiene como objetivo determinar el potencial inmunotóxico de distintas variedades de *Triticum monococcum* (diploide) y compararlo con trigos tetraploides y hexaploides y confirmar que puede ser una especie menos tóxica de trigo para estos enfermos.

En este trabajo, se ha realizado la cuantificación de las prolaminas presentes en las diferentes muestras de trigo y la determinación de su afinidad con el anticuerpo monoclonal G12, específico frente al péptido 33-mer, uno de los péptidos más inmunogénicos del gluten. Se ha calculado la concentración de gluten total y de los péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) de las distintas especies de trigo.

Los resultados muestran que la especie *T. monococcum* presenta menos contenido en gluten tóxico y GIP que los otros tipos de trigo objeto de estudio (*Triticum aestivum*, *Triticum durum* y *Tritordeum*), además existen diferencias entre las secuencias inmunotóxicas de todos ellos. Por lo tanto, esta especie de trigo podría ser más segura para los celíacos mejorando su calidad de vida.

**Palabras clave:** enfermedad celíaca, gluten, prolaminas, péptidos inmunogénicos del gluten, péptido 33-mer.



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

### A

---

APS: persulfato amónico

ADN: ácido desoxirribonucleico

AEM: anticuerpo anti-endomisio

AGA: anticuerpo anti-gliadina

ATGT: anticuerpo anti-transglutaminasa tisular

ARN: ácido ribonucleico

### B

---

BSA: albúmina sérica bovina

### C

---

Cu<sup>1+</sup>, Cu<sup>2+</sup>: cobre con valencia 1 y 2, respectivamente

CPA: células presentadoras de antígeno

CDs: células dendríticas

### D

---

DSG: dieta sin gluten

### E

---

EC: enfermedad celíaca

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

et al.: y colaboradores

### G

---

g: gramos

GIP: péptidos inmunogénicos del gluten

## **H**

---

H<sub>2</sub>O: agua

HCl: ácido clorhídrico

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico

HLA: antígeno leucocitario humano

## **I**

---

IL-15: interleucina-15

iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible

## **K**

---

KDa: kilodalton

## **L**

---

l: litros

LIE: linfocitos intraepiteliales

## **M**

---

mg: miligramos

ml: mililitros

M: molar

mM: milimolar

## **N**

---

ng: nanogramos

nm: nanómetros

NaCl: cloruro sódico

NIRS: espectroscopía de infrarrojo cercano



## **P**

---

pH: concentración de iones o cationes de hidrógeno

ppm: partes por millón

PM: peso molecular

PVDF: fluoruro de polivinilideno

## **R**

---

rpm: revoluciones por minuto

## **S**

---

SDS: dodecil sulfato sódico

## **T**

---

TBS: tampón Tris-HCl + NaCl

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina

Tris: 2-amino-2-(hidroximetil)-1, 3-propanodiol

tTG: transglutaminasa tisular

## **Y**

---

Y cols.: y colaboradores

## **Varios**

---

°C: grados centígrados

μl: microlitros

33-mer: péptido de 33 aminoácidos de la α-2 gliadina



## ÍNDICE

---

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Patología de la enfermedad celíaca</b>	<b>6</b>
1.1.1. El gluten	6
1.1.2. Respuesta inmunológica	7
1.1.3. Factores genéticos	8
1.1.4. Factores ambientales	9
<b>1.2. Epidemiología de la enfermedad celíaca</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad celíaca</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Diagnóstico de la enfermedad celíaca</b>	<b>11</b>
1.4.1. Biopsia intestinal	11
1.4.2. Métodos serológicos	11
1.4.3. Marcadores de riesgo genético	11
<b>1.5. Tratamiento actual de la enfermedad celíaca</b>	<b>11</b>
<b>1.6. Origen de los trigos de consumo humano</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Materiales</b>	<b>16</b>
3.1.1. Material vegetal	16
3.1.2. Anticuerpos	16
3.1.3. Reactivos para la extracción y cuantificación de proteínas	16
3.1.4. Reactivos para los geles SDS-PAGE y Western Blot	16
3.1.5. Reactivos para ELISA	17
<b>3.2. Métodos</b>	<b>18</b>
3.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas mediante BCA™	18
3.2.2. Geles SDS-PAGE	19
3.2.3. Western Blot	20
3.2.4. ELISA (iVYLISA GIP-S)	20

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>22</b>
4.1. Cuantificación de prolaminas presentes en las muestras de <i>T. monococcum</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i> y <i>Tritordeum</i> mediante BCA™	22
4.2. Caracterización de las prolaminas de <i>T. monococcum</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i> y <i>Tritordeum</i> mediante movilidad electroforética	23
4.3. Estudio de la afinidad relativa del anticuerpo G12 por los distintos tipos de trigo mediante Western Blot	24
4.4. Determinación de la concentración de gluten y de péptidos inmunogénicos presentes en los tipos de trigo mediante ELISA	25
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>28</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>29</b>

## FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Diferencias morfológicas entre la mucosa normal (A) y mucosa patológica de un enfermo celíaco (B)	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Conjunto de factores que desencadenan la patogenia del gluten	<b>6</b>
<b>Figura 3.</b> Respuesta adaptativa frente al gluten	<b>8</b>
<b>Figura 4.</b> Origen de los trigos de consumo humano	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Fundamento del ensayo de BCA™	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b> Recta patrón de concentración de albúmina sérica bovina (BSA)	<b>19</b>
<b>Figura 7.</b> Curvas estándares frente al péptido 33-mer (A) y frente a la gliadina (B)	<b>21</b>
<b>Figura 8.</b> Geles SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida teñidos con azul coomasie de <i>T. monococcum</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i> y <i>Tritordeum</i>	<b>24</b>
<b>Figura 9.</b> Western Blot de las prolaminas de <i>T. monococcum</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i> y <i>Tritordeum</i>	<b>25</b>
<b>Figura 10.</b> Determinación del péptido 33-mer (A) y gluten total (B) mediante la técnica ELISA utilizando el anticuerpo G12-HRP de <i>T. monococcum</i> (TM1-TM7), <i>T. aestivum</i> (Yecora, Jerezano y Anza), <i>T. durum</i> (Simeto) y <i>Tritordeum</i>	<b>26</b>

## TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Manifestaciones clínicas de la EC en niños	<b>10</b>
<b>Tabla 2.</b> Componentes de los geles SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida	<b>19</b>
<b>Tabla 3.</b> Concentración de prolaminas medidas mediante BCA™ de los trigos <i>T. monococcum</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i> y <i>Tritordeum</i>	<b>23</b>

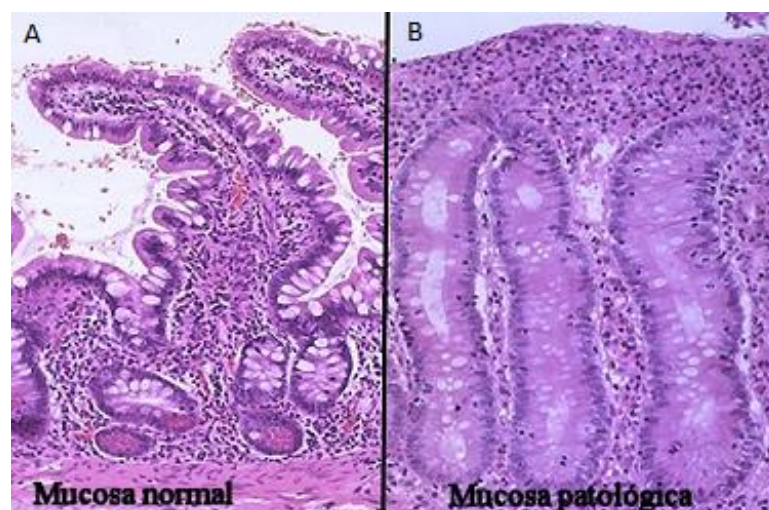


## 1. INTRODUCCIÓN

---

La enfermedad celíaca (EC) es una patología que afecta al intestino delgado proximal y que está asociada a una intolerancia permanente al gluten y que frecuentemente viene acompañada de malabsorción intestinal (Arranz y Garrote, 2011). El gluten se encuentra en cereales como el trigo, la avena, la cebada y el centeno, así como en sus derivados. Cuando los pacientes con EC consumen alimentos que contienen gluten, su sistema inmune se activa dañando la mucosa del intestino delgado dando lugar a la atrofia de las vellosidades del intestino junto con hiperplasia de las criptas (**Figura 1**). Se desarrolla en personas genéticamente predispuestas, contribuyendo también determinados factores ambientales.

Esta enfermedad se encuentra muy distribuida en la sociedad, afectando al 1% de la población y pudiendo ser diagnosticada a cualquier edad. Actualmente, la única terapia que resulta efectiva para esta patología es una dieta sin gluten (DSG) durante toda la vida, lo que supone un gran esfuerzo por parte de los celíacos debido a la gran cantidad de productos que contienen gluten, además del coste que supone los alimentos alternativos (Alaedini y Green, 2005). Con la DSG se mejora la sintomatología de manera significativa, pero a veces pueden aparecer transgresiones en la dieta debido a la dificultad de compaginarla con la vida social. Esto puede provocar la recuperación incompleta del intestino o la aparición de una EC refractaria, que se caracteriza por inflamación crónica y puede estar asociada con cáncer digestivo (Daum y cols., 2005; Real, 2010; Arranz y Garrote, 2011).



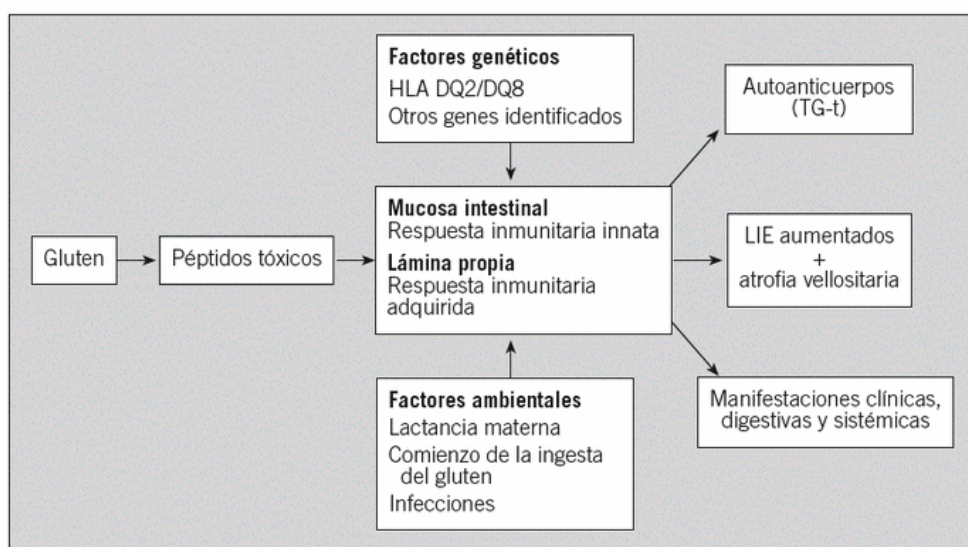
**Figura 1.** Diferencias morfológicas entre la mucosa normal (A) y mucosa patológica de un enfermo celíaco (B) (Gregorio, 2011).

## 1.1 PATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

El desarrollo de la enfermedad se debe a la combinación entre unos factores ambientales (el gluten), factores genéticos (el sistema HLA) y unos factores inmunológicos (la respuesta linfocitaria T intestinal) tal y como se resume en la **Figura 2**.

### 1.1.1. El gluten

El gluten es un conjunto de proteínas que se encuentra en la semilla de muchos cereales como el trigo, el centeno, la cebada y la avena, y sus derivados. Estas proteínas se agrupan en dos fracciones: las prolaminas, concretamente gliadinas, hordeínas, secalinas o aveninas dependiendo del cereal al que nos estemos refiriendo (trigo, cebada, centeno o avena), que son solubles en etanol, y las gluteninas, que son insolubles (Wieser, 1995; Real, 2010). Presentan un alto porcentaje en prolina y glutamina (15% y 35%) (Stern y cols., 2001; Real, 2010). Debido a ello, estas proteínas no son digeridas por proteasas gastrointestinales formándose péptidos que llegan a la mucosa intestinal donde la transglutaminasa tisular (tTG) transforma la glutamina en ácido glutámico, lo que desencadena una serie de respuesta inmunológicas por parte de nuestro organismo cuya consecuencia más importante es la pérdida de las vellosidades intestinales (Cornell y Townley, 1973). Entre los péptidos más tóxicos se encuentra el péptido 33-mer cuya secuencia de 33 aminoácidos es LQLQFPQPQLPVPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF que es muy resistente a la proteólisis enzimática gástrica, pancreática e intestinal y contiene 6 epítomos de reconocimiento de las células T (Shan y cols, 2002; Sollid, 2002).



**Figura 2. Conjunto de factores que desencadenan la patología del gluten** (Casellas i Jordà, 2006).



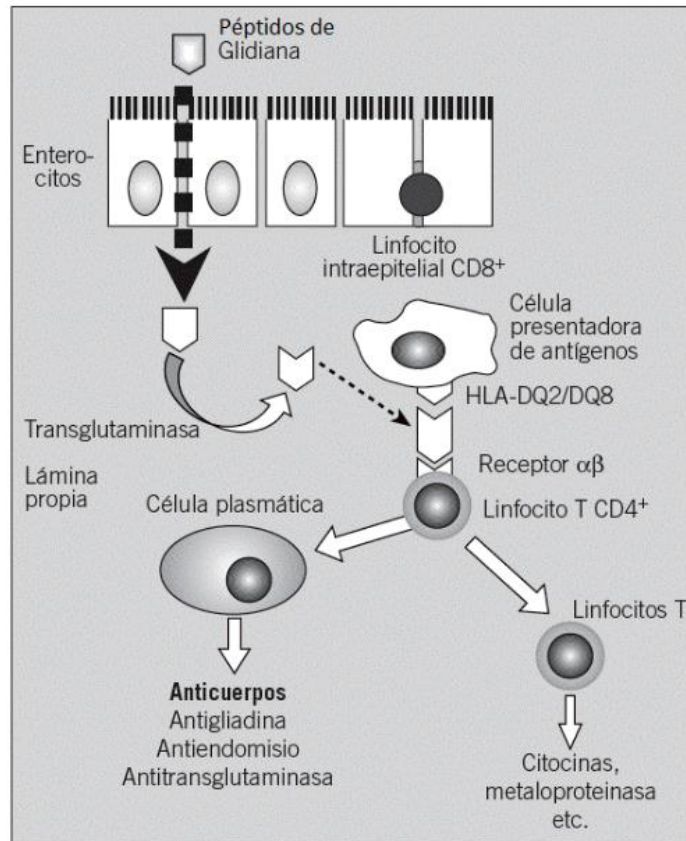
### 1.1.2. Respuesta inmunológica

El desarrollo de las lesiones intestinales propias de la EC tiene una base autoinmune caracterizada por la aparición de autoanticuerpos y la activación de linfocitos de la lámina propia intestinal. El gluten tiene un efecto dual en la mucosa del intestino delgado, uno mediado por la inmunidad innata (efecto tóxico directo del gluten sobre el epitelio) y otro por la inmunidad adaptativa o específica (a través de los linfocitos T CD4+ de la lámina propia) (Brandtzaeg, 2006).

La respuesta innata se basa en la expresión local de la interleucina-15 (IL-15) que media la linfocitosis intraepitelial y la destrucción de las vellosidades (Maiuri y cols., 2003). Esta citoquina favorece la activación y proliferación de los linfocitos intraepiteliales (LIE). Además, la IL-15 aumenta la capacidad citotóxica de los LIE sobre los enterocitos (apoptosis) e induce la formación de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) favoreciéndose la presencia de especies reactivas de oxígeno que contribuyen a un estado de estrés oxidativo. Esto facilita la retroalimentación de la respuesta innata junto con la secreción de mediadores inflamatorios inespecíficos por parte de los LIE. Finalmente, la IL-15 debilita las uniones *tight-junctions* y con ello contribuye al aumento de la permeabilidad intestinal y al paso del gluten hasta la lámina propia, donde se desencadena la respuesta adaptativa (Sander y cols., 2005). Por tanto, la IL-15 actúa como un nexo de unión entre ambas respuestas inmunes ya que también activa las células dendríticas (CDs) y con ellos a los linfocitos T CD4+ que intervienen en la respuesta adaptativa (Ohteki y cols., 2001).

La respuesta adaptativa (**Figura 3**) ocurre debido a la infiltración de la lámina propia ocasionada por la IL-15 que hace posible que péptidos no digeridos como el 33-mer lleguen a ella. Allí se encuentra la transglutaminasa tisular (tTG) que cataliza la desaminación de la glutamina. Como consecuencia, los aminoácidos de la gliadina con carga positiva, se cargan negativamente y tienen más afinidad por las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 de las CDs (Fleckenstein y cols., 2004). Estas células presentadoras de antígenos (CPA) presentan el péptido desaminado a los linfocitos T CD4+ que se activan dando lugar a una respuesta dominada por citoquinas pro-inflamatorias (Nilsen y cols., 1998). También se liberan factores de crecimiento keratolítico y metaloproteasas. Todo ello origina finalmente una lesión caracterizada por linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas y aplanamiento de las vellosidades, así como la atracción de nuevas células pro-inflamatorias a la lámina propia.

Otro efecto de la liberación de citoquinas al activarse los linfocitos T es la activación subsiguiente de linfocitos B que estimulan la producción de anticuerpos y la lesión intestinal. Algunos de estos anticuerpos tienen un gran valor diagnóstico.



**Figura 3. Respuesta adaptativa frente al gluten.** Los péptidos no digeridos procedentes de la gliadina alcanzan la lámina propia donde son desaminados por la tTG. Así, aumenta su afinidad por las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 de las CDs, que los presentan a los linfocitos T CD4+. Estos se activan y dan lugar a citoquinas pro-inflamatorias que provocan las lesiones en la mucosa. Por otro lado, se activan linfocitos B que producen anticuerpos que también contribuyen a la lesión (Casellas i Jordà, 2006).

### 1.1.3. Factores genéticos

La base genética de la EC reside en la asociación con los genes del sistema HLA, más fuertemente con el HLA-DQ2 y en segundo lugar con el HLA-DQ8. En la mayoría de las poblaciones de pacientes estudiadas, más del 90% expresan el heterodímero HLA-DQ2 codificado por los alelos DQA1\*05 y DQB1\*02, y el resto expresan HLA-DQ8. La EC tiene una alta heredabilidad ya que en el 80% de los casos con gemelos, se presenta la enfermedad en ambos hermanos (Greco y cols, 2002), así como alrededor de un 10% entre familiares de primer grado. Por tanto, la relación entre la expresión de ciertos alelos de los heterodímeros HLA-DQ2 y HLA-DQ8 y la EC justifica la presencia de una predisposición familiar.

#### 1.1.4. Factores ambientales

Los factores ambientales suponen también un papel importante en el desarrollo de la enfermedad celíaca. Existen estudios que cuestionan el efecto protector materno y cuándo es el mejor momento para la introducción del gluten en la dieta del lactante (Ivarsson y cols., 2000). Un estudio actual apunta que no existe una evidencia clara que apoye que la introducción temprana de gluten en la dieta infantil se asocie a un mayor riesgo de EC. Sin embargo, una introducción tardía sí puede contribuir a aumentar el riesgo de EC (Pinto-Sánchez y cols., 2016).

### 1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

La enfermedad celíaca es una patología que hace unos años era considerada como poco frecuente, que afectaba principalmente a los niños manifestándose como un cuadro de malabsorción. Hoy en día, la EC es una enfermedad frecuente que se encuentra distribuida a nivel mundial, afectando tanto a niños como a adultos y pudiendo ser diagnosticada a cualquier edad. Este cambio se debe a un mayor conocimiento de la patología y al avance de las pruebas de diagnóstico, fundamentalmente los métodos serológicos (Arranz y Garrote, 2011).

Actualmente, la prevalencia es más del 1% de la población, aunque se estima que, por cada caso conocido, hay entre 5 y 7 casos sin diagnosticar (Catassi y cols., 1996). La prevalencia de la enfermedad va a depender de la frecuencia del HLA-DQ2/DQ8 en la población, así en Japón que hay una frecuencia muy baja, mientras que, entre la población saharauí, donde el 40% son portadores del HLA-DQ2 (Catassi y cols., 2001) y hay una ingesta importante de cereales, la EC se desarrolla hasta en el 5% de la población (Catassi y cols., 1999).

Estas diferencias entre países podrían ser debido a la actuación frente a distintos factores ambientales (infecciones gastrointestinales, momento de inicio del consumo del gluten, etc). Respecto al sexo, la EC se da más en mujeres que en hombres (2:1) y en cuanto a edad, existen dos picos, entre 1 y 3 años en niños y entre 30 y 50 años en adultos (Arranz y Garrote, 2011).

Existen patologías en las que aumenta el porcentaje de padecer EC, como por ejemplo la enfermedad tiroidea autoinmune. Aproximadamente 1 de cada 62 pacientes con esta enfermedad tienen EC con biopsia verificada, por lo que se argumenta que pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune deben ser examinados para comprobar la EC (Roy y cols., 2016). Otras patologías relacionadas con la EC son las enfermedades gastrointestinales, inflamatorias y otras autoinmunes.

### 1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

Las manifestaciones clínicas de la EC varían según la edad y la forma en que se presente (Tabla 1).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de la EC en niños

TIPO DE EC	TIPO DE SÍNTOMAS	EJEMPLOS
<b>Clásica</b>	Síntomas digestivos	Diarrea, anorexia, malnutrición, vómitos
<b>Atípica</b> (Stern y cols., 2001)	Síntomas extraintestinales	Anemia, retraso del crecimiento, osteopenia
<b>Silente</b> (Eiras y cols., 2002)	No presentan manifestaciones clínicas, pero sí lesiones típicas de la EC en la mucosa del intestino o aumento de LIE	
<b>Latente</b> (Arranz y Garrote, 2011)	No presentan sintomatología clínica y la biopsia intestinal es normal o sólo con aumento de LIE. Más tarde presentan atrofia de las vellosidades, con normalización histológica al retirar el gluten y reaparición si se introduce de nuevo (suelen ser familiares de pacientes celíacos)	

Las enfermedades asociadas a la EC del niño suelen ser autoinmunes (tiroiditis, dermatitis, hepatitis, cirrosis, enfermedad inflamatoria, artritis, etc), estos pacientes tienen mayor riesgo de padecerlas que la población general, aunque también se asocia con otras enfermedades neurológicas y otros síndromes como el Síndrome de Down (Polanco, 2005). Es importante señalar que, debido a la reducción de la inmunidad y la pérdida de vellosidades intestinales, los celíacos quedan expuestos a agentes infecciosos y son más propensos a padecer una infección, pudiendo desarrollar una complicación sistémica (Rostami Nejad y cols., 2015).

En cuanto a la EC en el adulto, se manifiestan los mismos síntomas gastrointestinales que en el niño. También existen manifestaciones extraintestinales que pueden ser cutáneas, hematológicas, neurológicas, articulares, hepáticas, endocrinológicas, ginecológicas, psiquiátricas y linfomas. Las enfermedades asociadas suelen ser las mismas que en los niños (Arranz y Garrote, 2001).

Por último, destacar la EC refractaria que es aquella que no responde a la DSG y se caracteriza por inflamación crónica y puede estar asociada con cáncer digestivo (Daum y cols., 2005).

#### **1.4. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA**

El diagnóstico de la EC se establece mediante una combinación de hallazgos clínicos, serológicos y morfológicos, todo ello asociado a una buena respuesta tras un tiempo con DSG.

##### **1.4.1. Biopsia intestinal**

Las biopsias intestinales son la clave para el diagnóstico de la mayoría de los casos de EC. Son inocuas y carentes de complicaciones, sin embargo, son molestas y mal aceptadas por personas asintomáticas. Por ello, actualmente en el diagnóstico y el cribado está teniendo más fuerza seguir la estrategia de realizar primero pruebas serológicas (determinación de anticuerpos) o el estudio de marcadores de riesgo genéticos (sistema HLA) antes de indicar la biopsia del duodeno (Mulder y Cellier, 2005). Una vez que los resultados dan positivo, se procedería a realizar la biopsia para confirmar la EC (Dorn y Matchar, 2008).

##### **1.4.2. Métodos serológicos**

En la respuesta adaptativa, se originan una serie de anticuerpos que tienen un papel fundamental en el diagnóstico de la EC. Actualmente los anticuerpos que se determinan para el diagnóstico de la EC mediante ELISA son: los anticuerpos anti-gliadina (AGA), los anticuerpos anti-endomisio (AEM) y los anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (ATGT) (Hill y cols., 2005). En niños menores de 2 años con sospecha de EC, se combinaría la detección de los ATGT con la detección de los anticuerpos contra los péptidos desaminados de la gliadina (Rubio-Tapia, 2013).

##### **1.4.3. Marcadores de riesgo genético**

Por el momento, los únicos marcadores de riesgo de EC con utilidad clínica son los alelos del HLA-DQB1\*02 (codifica el marcador HLA-DQ2) y \*0302 (codifica el marcador HLA-DQ8), y DQA1\*05 (codifica el marcador HLA-DQ2). La identificación aislada de los alelos de riesgo que codifican para las moléculas DQ2 o DQ8 no permite el diagnóstico de la EC, pero es muy útil en determinadas situaciones como en los casos donde las pruebas histológicas y serológicas no coinciden, así como para seleccionar individuos con mayor susceptibilidad a la EC en un grupo de riesgo (Arranz y Garrote, 2011).

### 1.5. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

En la actualidad, el único tratamiento eficaz y disponible para la EC es la DSG de por vida, que consiste en la exclusión de la dieta de las gliadinas y gluteninas, y de sus homólogos en la cebada, el centeno y la avena, así como los híbridos de estos cereales y sus derivados. Es difícil la adherencia a la DSG debido a la limitada variedad de productos sin gluten apetecibles y su elevado coste. Además, la DSG puede tener consecuencias negativas en forma de deficiencias nutricionales relacionadas con la ingestión inadecuada de algunos micronutrientes. Estudios recientes demuestran que la DSG es pobre en fibra debido a la exclusión de alimentos ricos en fibra como los granos. La DSG no aporta micronutrientes como la vitamina D, vitamina B12 y ácido fólico, por lo que es importante la calidad de la dieta y la educación alimentaria del celíaco para suplir esas deficiencias (Vici, 2016).

Las dificultades para realizar la DSG han impulsado la investigación de alternativas terapéuticas, aunque en la actualidad ninguna de ellas es todavía una realidad práctica. Algunas se basan en la detoxificación del gluten mediante la proteólisis enzimática con polipolipeptidasas, de manera que los péptidos tóxicos se digieren y no originan la respuesta inmune (Matysiak-Budnik, 2005). Otras se fundamentan en la inmunopatogenia de la EC como el acetato de larazotido que cierra las uniones intercelulares impidiendo el paso a la lámina propia de los péptidos no digeridos del gluten desde el epitelio, o el bloqueo de la tTG y los receptores DQ2 por lo que no habría unión a las CPA ni presentación del antígeno (Chirido y cols., 2005). También hay estrategias que favorecen la tolerancia al gluten mediante una vacuna desensibilizante obtenida del parásito *Necator americanus* (NEXVAX<sub>2</sub>), o la tolerancia oral mediante la administración de dosis controladas de gluten. Por último, se plantea la posibilidad de obtener, mediante ingeniería genética, cereales exentos de péptidos tóxicos y que conservan sus propiedades. Siguiendo esta línea tenemos el pan con trigo transgénico a partir de harinas sin gliadinas y con unas características organolépticas comparables a las del pan tradicional. Este pan es apto para los intolerantes al gluten excepto para los que presentan EC refractaria. Existen también estudios donde se pretende distinguir líneas de trigos con bajo contenido en gliadinas, obtenidas por ARN de interferencia, mediante Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS). De esta manera, estas líneas pueden ser utilizadas directamente o mezclados con otros cereales no tóxicos, como materia prima para el desarrollo de productos alimenticios que pueden ser toleradas de manera segura por los pacientes con EC (Gil-Humanes y cols., 2014, García-Molina y cols., 2016). Otra posibilidad sería la selección de trigos menos tóxicos, como la especie diploide *Triticum monococcum*, tal y como se persigue demostrar en este estudio.

## 1.6. ORIGEN DE LOS TRIGOS DE CONSUMO HUMANO

En este apartado se describe la evolución del trigo y cómo se han obtenido los distintos tipos de trigo para el consumo humano.

El ancestro de todos los trigos se diversificó y dio lugar a distintas especies de los géneros *Triticum* y *Aegilops*. Las especies que dieron lugar a las especies de trigo que conocemos hoy día son *Triticum boeoticum* (*T. boeoticum*), *Triticum urartu* (*T. urartu*), *Aegilops tauschii* y otras dos especies de *Aegilops* muy similares al actual *A. speltoides*. Todas estas especies, al igual que el ancestro común, son diploides (dos juegos de cromosomas). El trigo se reproduce y genera individuos con la misma dotación cromosómica, pero las especies de trigo también son proclives a generar híbridos con otras especies, lo que se conoce como alopoliploidía, es decir, dos especies diploides generan otra tetraploide (4 juegos de cromosomas). La hibridación de *T. urartu* con la especie parecida a *A. speltoides* produjo la especie tetraploide *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Esta especie y *T. boeoticum* fueron los primeros trigos cultivados por el hombre. Así, la versión cultivada de *T. boeoticum* se conoce científicamente como ***Triticum monococcum***. Y la versión cultivada de *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* se llama científicamente *Triticum dicoccum*, a partir del cual surgen todos los trigos tetraploides actuales (entre los que se encuentran ***Triticum durum***). *T. dicoccum* hibridó con la especie diploide *A. tauschii*, lo que dio lugar a los trigos hexaploides, entre ellos la espelta y el trigo común o panadero (***Triticum aestivum***). Este último es, con diferencia, el más cultivado en el mundo (Matsouka, 2011; Dvorak y cols., 2012). Un resumen de lo anteriormente descrito se muestra en la **Figura 4**.





## 2. OBJETIVOS

---

El cumplimiento de la DSG presenta muchas veces dificultades debido a ingestas inadvertidas, pero, especialmente, debido a transgresiones voluntarias, ya sean por desconocimiento del paciente ante las consecuencias de la ingesta de gluten, por sucumbir a la tentación de ingerir comidas no permitidas en la dieta, pero altamente apetecibles por el enfermo o por la presión social que supone tener que demandar un tratamiento especial a la hora de comer. Como resultado distintas estrategias han sido propuestas con el objetivo de conseguir nuevas terapias capaces de actuar como coadyuvantes a la DSG. Una posibilidad sería la selección de trigos naturales menos tóxicos, lo que podría contribuir a la mejora de la calidad y variedad de los alimentos destinados al colectivo celíaco. Con estos antecedentes el OBJETIVO GENERAL de este Trabajo Fin de Grado fue determinar el potencial inmunotóxico de distintas variedades de *T. monococcum* y compararlo con trigos tetraploides y hexaploides para su posible uso en la elaboración de alimentos aptos para las personas intolerantes al gluten.

El OBJETIVO GENERAL de este trabajo fue desarrollado en los siguientes OBJETIVOS CONCRETOS:

1. Cuantificación de las prolaminas presentes en las muestras de *T. monococcum*, *T. aestivum*, *T. durum* y *Triticum*.
2. Caracterización de las prolaminas de *T. monococcum* y comparación con las prolaminas de otros trigos.
3. Estudio de la afinidad relativa del anticuerpo G12 frente a *T. monococcum*.
4. Determinación de la concentración de gluten y péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) presentes en *T. monococcum* mediante técnicas inmunológicas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.1. MATERIALES

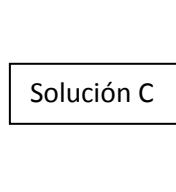
##### 3.1.1. Material vegetal

En este trabajo se han utilizado semillas de trigo diploides, tetraploides y hexaploides. Dentro de los diploides se emplearon diferentes variedades de la especie *T. monococcum* (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7), tres variedades hexaploides de *T. aestivum* (Yecora, Jerezano, y Anza) y una variedad tetraploide de *T. durum* (Simeto). También se trabajó con una variedad de *Tritordeum* y como control negativo se utilizó arroz (*Oriza sativa*, variedad J. Sendra)

##### 3.1.2. Anticuerpos

El anticuerpo utilizado en este estudio fue el anticuerpo G12, suministrado por Biomedal S. L. (Sevilla, España). Se trata de un anticuerpo obtenido frente al péptido 33-mer de la gliadina, LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPQPF. Así mismo, se empleó el anticuerpo G12 conjugado con peroxidasa (G12-HRP) y el anticuerpo anti-Ig G conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma; Missouri, EEUU).

##### 3.1.3. Reactivos para la extracción y cuantificación de proteínas

- 
- Etanol 70%
  - Kit BCA™
  - H<sub>2</sub>O
  - Glicerol 4.8x10<sup>-3</sup> M (Sharlau; Barcelona, España)
  - Tris-HCl 1.5 M [GE Healthcare (Sevilla, España) y Panreac (Barcelona, España)]
  - SDS 6.9x10<sup>-3</sup> M (Sigma; Missouri, EEUU)

##### 3.1.4. Reactivos para los geles SDS-PAGE y Western Blot

- H<sub>2</sub>O
- Tris-HCl [GE Healthcare (Sevilla, España) y Panreac (Barcelona, España)]
- Acrilamida (BIO-RAD; California, EEUU)
- Bisacrilamida (BIO-RAD; California, EEUU)
- APS 1% (GE Healthcare; Sevilla, España)
- SDS 10% (Sigma; Missouri, EEUU)
- TEMED (Thermo Scientific; Massachusetts, EEUU)

Tampón electroforesis 1x	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Azul de Coomasie (BIO-RAD; California, EEUU)</li> <li>• Tris <math>2.5 \times 10^{-2}</math> M (GE Healthcare; Sevilla, España)</li> <li>• Glicina <math>1.9 \times 10^1</math> M (GE Healthcare; Sevilla, España)</li> <li>• SDS <math>3.5 \times 10^{-3}</math> M (Sigma; Missouri, EEUU)</li> </ul>
Solución transferencia 5x	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris <math>2.5 \times 10^{-2}</math> M (GE Healthcare; Sevilla, España)</li> <li>• Glicina <math>1.9 \times 10^1</math> M (GE Healthcare; Sevilla, España)</li> <li>• Metanol <math>5.1 \times 10^{-3}</math> M (Sigma; Missouri, EEUU)</li> </ul>
TBS- 0.01%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tris <math>2.5 \times 10^{-2}</math> M (GE Healthcare; Sevilla, España)</li> <li>• NaCl <math>7.5 \times 10^{-2}</math> M (Scharlau; Barcelona, España)</li> <li>• Tween 20 (Panreac; Barcelona, España)</li> <li>• TBS 5% leche</li> <li>• Pastilla buffer Tris-HCl (Sigma; Missouri, EEUU)</li> <li>• Pastilla rojo naptol (Sigma; Missouri, EEUU)</li> <li>• Membrana de PVDF (Millipore; Darmstadt, Alemania)</li> <li>• Solución C</li> <li>• Azul de bromofenol <math>3 \times 10^{-4}</math> M (Sigma; Missouri, EEUU)</li> <li>• Marcador de pesos moleculares (BIO-RAD; California, EEUU)</li> </ul>

### 3.1.5. Reactivos para ELISA

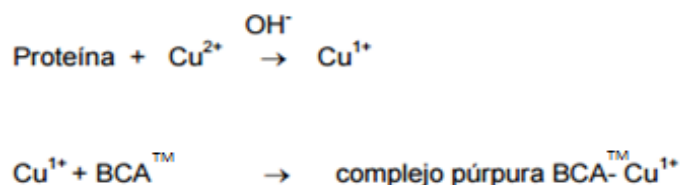
Todos los materiales y reactivos forman parte del mismo kit suministrado por Biomedal Diagnostic (Sevilla, España). Estos son:

- 12 tiras multipocillos con 8 pocillos cada una
- Solución de lavado 10x
- Solución de dilución
- Solución de extracción
- Solución de sustrato
- Solución de stop
- Anticuerpo G12-HRP conjugado
- Control positivo
- Control negativo
- Control interno
- 5 patrones iVYLISA GIP-S con 50, 25, 6.25, 3.12 y 1.56 ng/ml de GIP

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas mediante BCA™

El ensayo BCA™ es un método para la cuantificación de proteínas que se basa en la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  por los enlaces peptídicos de las proteínas en medio alcalino. Los iones  $\text{Cu}^{1+}$  resultantes se unen a las moléculas de BCA™ dando lugar a un cromóforo púrpura que absorbe a 562 nm (**Figura 5**).



**Figura 5. Fundamento del ensayo BCA™**

La absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteínas presente. Para poder establecer una relación entre la concentración y la absorbancia, nuestras muestras se compararon con una curva de muestras estándares de concentración conocida de albúmina sérica bovina (BSA) a partir de la cual extrapolamos y se obtienen los resultados.

Con respecto a la preparación de las muestras objeto de estudio, primero se pesaron 0.05 g de cada una de ellas y se les adicionó 1 ml de etanol al 70% para la extracción de proteínas. Posteriormente se agitaron en la noria durante una hora y se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos y se dejó reposar el sobrenadante toda la noche a 65°C. El precipitado resultante se resuspendió con 500 µl de solución C (descrita en el apartado 3.1.3 de materiales y métodos). Se realizó también una dilución 1:10 con 90 µl de solución C y 10 µl de cada muestra.

A continuación, se cargó la placa con 25 µl de muestra y 200 µl de solución de trabajo en cada pocillo de la placa multipocillo y se incubó durante 30 minutos a 37°C tapando previamente con parafil. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 562 nm. Por último, para obtener los resultados se extrapolaron nuestras medidas en la curva de las concentraciones estándar de la BSA (**Figura 6**).

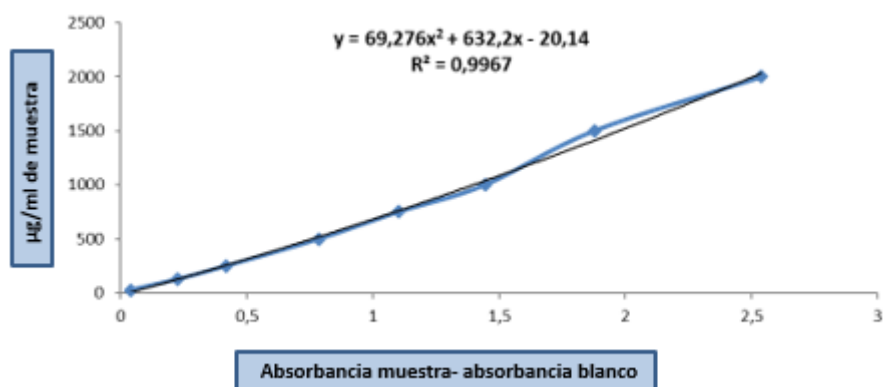


Figura 6. Recta patrón de concentración de albúmina sérica bovina (BSA)

### 3.2.2. Geles SDS-PAGE

Para la detección de las proteínas de las distintas muestras se usaron geles de poliacrilamida al 12,5%; las proteínas se separaron por su movilidad electroforética y se identificaron sus pesos moleculares (PM). En nuestro caso, se prepararon dos geles, uno de ellos para Western Blot y otro para tinción con azul de coomasie. La preparación de los geles se efectuó con los componentes siguientes (**Tabla 2**):

Tabla 2. Componentes de los geles SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida

	Gel de resolución	Gel de empaquetamiento
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2.15 ml	2.33 ml
<b>Tris-HCl</b>	3.8 ml (1.5 M; pH 8.8)	400 µl (0.5 M; pH 6.8)
<b>Acrilamida</b>	3.1 ml	438 µl
<b>Bisacrilamida</b>	0.6 ml	87.5 µl
<b>APS 1%</b>	250 µl	175 µl
<b>SDS 10%</b>	100 µl	35 µl
<b>TEMED</b>	5 µl	3.5 µl
<b>Volumen final</b>	10 ml	3.5 ml

Vertidos los reactivos en las placas, se cargaron cada pocillo con 10 µl totales entre un determinado volumen para 10 µg de muestra y solución C, excepto el primero, al que solo se añadieron 5 µl del marcador de PM.

### 3.2.3. Western Blot

El Western Blot es una técnica analítica para la detección de proteínas mediante la electroforesis en gel, donde se separan las proteínas atendiendo a su movilidad electroforética y se identifican con un marcador de PM.

Para realizar la electroforesis se colocaron los geles en las placas y se introdujeron en una cubeta a la que se le añadió tampón de electroforesis 1x y se sometieron a una corriente de 150 voltios durante 90 minutos. Se dejaron correr las muestras por los geles hasta el final.

Con uno de los geles se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF mediante una corriente de 100 voltios en agitación. Posteriormente, se lavó la membrana tres veces con TBS-0,01% Tween 20 y se bloqueó con TBS-5% leche. A continuación, se añadió el anticuerpo G12 en TBS-5% leche en agitación a 4°C toda la noche. Por último, se añadió el anticuerpo 2º en TBS-5% leche y se procedió al revelado con rojo naptol.

### 3.2.4. ELISA (iVYLISA GIP-S)

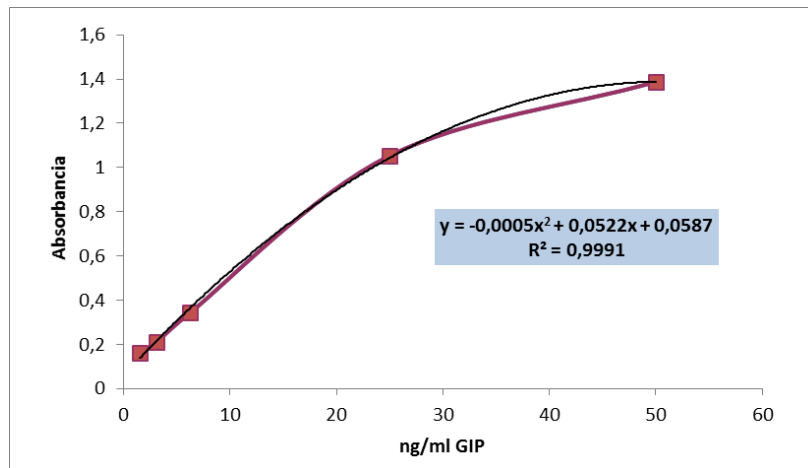
El ELISA Sandwich es un ensayo cuantitativo diseñado para la detección y cuantificación de GIP. Se trata de un método directo por lo que, a mayor señal procedente de la placa, mayor concentración de gluten en la muestra. Se realizaron dos ensayos, uno frente a una curva estándar de péptido 33-mer y otra frente a una curva estándar de gliadina (**Figura 7**).

En primer lugar, se pesaron 0.05 g de cada una de las muestras de trigo dentro de tubos eppendorf en una balanza analítica. A todos los tubos se les adicionaron 500 µl de la solución de extracción (etanol al 60%) y posteriormente se mezclaron vigorosamente en un vórtex. A continuación, los tubos se agitaron durante 60 minutos. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio.

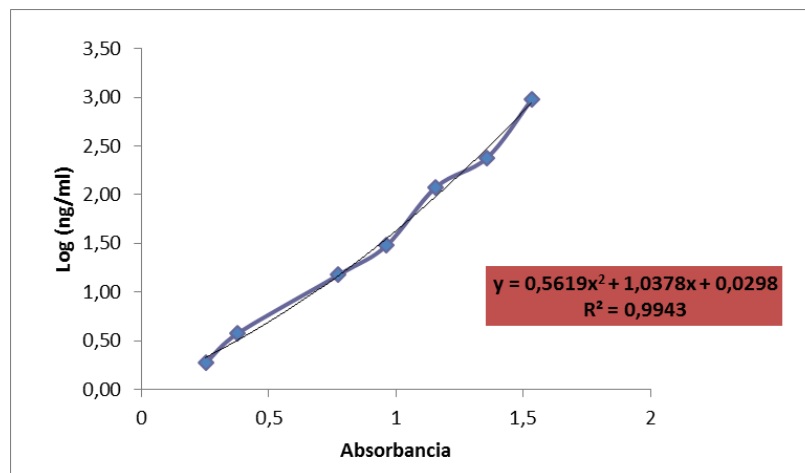
Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de 1:100 a 1:500000, en solución de dilución ELISA. Posteriormente, se adicionó 100 µl de cada una de las muestras, así como los patrones (gliadina y péptido 33-mer) a la placa multipocillos y se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 60 minutos. Transcurrido ese tiempo, se procedió al primer lavado con la solución de lavado. Tras ello, adicionamos 100 µl del anticuerpo G12-HRP en cada pocillo y se volvió a cubrir la placa a temperatura ambiente y se incubó durante 60 minutos. A continuación, se realizó un segundo lavado y se adicionó 100 µl de la solución de sustrato, tras lo cual se mantuvo nuevamente en oscuridad la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Por último, se añadió 100 µl de la solución de stop para detener la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de placas ELISA.

**A**



**B**



**Figura 7. Curvas estándares frente al péptido 33-mer (A) y frente a la gliadina (B)**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 4.1. Cuantificación de prolaminas presentes en las muestras de *T. monococcum*, *T. aestivum*, *T. durum* y *Tritordeum* mediante BCA™

Debido a que la única terapia práctica para la EC es la DSG y presenta una serie de dificultades e inconvenientes, existen estudios sobre *T. monococcum* en los que se plantea su toxicidad reducida y así se proporciona fundamento para investigar sobre su seguridad y el posible uso de esta especie de trigos diploides. En 2013, un estudio de Zanini y cols. refleja la tolerancia de los pacientes celíacos al administrarles dosis de *T. monococcum*. Siguiendo esta línea, este trabajo persigue aportar más datos que demuestren que la toxicidad de *T. monococcum* es menor con respecto a otros trigos de consumo humano mediante una serie de métodos, ya que hoy en día no hay una conclusión definitiva.

El ensayo BCA es el método usado para la cuantificación de prolaminas de una serie de muestras de trigos diploides (*T. monococcum*), tetraploides (*T. durum*), hexaploides (*T. aestivum*) y de la especie *Tritordeum*. Gracias a la medición de la absorbancia de las distintas muestras y a la extrapolación de la recta patrón de concentración conocida de BSA, se obtiene como resultado los miligramos de prolaminas por gramo de harina presentes en cada una de ellas.

Los resultados se ven reflejados en la **Tabla 3** tras el tratamiento de los datos de absorbancia y su extrapolación en la recta patrón. Por lo general, los trigos diploides tienen una concentración de prolaminas similar a los demás trigos, exceptuando *T. aestivum* (Anza) cuya concentración es inferior a la de la especie *T. monococcum*. También se observa que la variedad TM7 de *T. monococcum* es la que presenta la mayor concentración de todas.

Dentro de la especie *T. monococcum*, los valores de mg prolaminas/g harina entre las distintas variedades se encuentran en un rango de 25 y 57.9 siendo el valor medio de 32.7 mg prolaminas/g harina.

Entre los otros tipos de trigos (*T. aestivum*, *T. durum* y *Tritordeum*), podemos observar que el valor medio está en torno a 30 mg prolaminas/g harina (ligeramente superior el trigo tetraploide al hexaploide) siendo el que tiene un valor más alto el *Tritordeum* y el más bajo el *T. aestivum* (Anza) con 39.8 y 18.3 mg prolaminas/g harina respectivamente.



**Tabla 3. Concentración de prolaminas medidas mediante BCA™ de los trigos *T. monococcum*, *T. aestivum*, *T. durum* y *Tritordeum***

	MUESTRA	mg/ml	mg prolaminas/ g harina
<b><i>T. monococcum</i></b>	TM1	2.85	28.5
	TM2	2.87	28.7
	TM3	2.90	29
	TM4	3.05	30.5
	TM5	2.91	29.1
	TM6	2.52	25.2
	TM7	5.79	57.9
<b><i>T. aestivum</i></b>	Jerezano	3.01	30.1
	Anza	1.83	18.3
<b><i>T. durum</i></b>	Simeto	3.03	30.3
<b><i>Tritordeum</i></b>	Tritordeum	3.98	39.8

#### 4.2. Caracterización de las prolaminas de *T. monococcum*, *T. aestivum*, *T. durum* y *Tritordeum* mediante movilidad electroforética

En este estudio hemos utilizado los geles SDS-PAGE al 12% de poliacrilamida para analizar el patrón de prolaminas en distintas especies de trigos. De esta forma, hemos podido comparar las fracciones proteicas resultantes gracias a la separación de las proteínas por movilidad electroforética y a la identificación de su tamaño molecular.

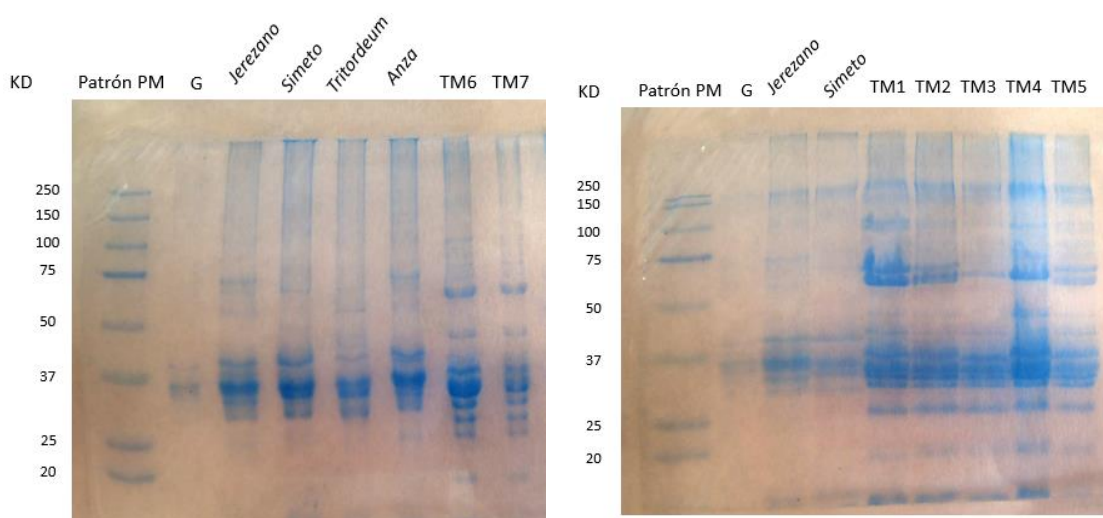
Tal y como se muestra en la **Figura 8**, los perfiles varían entre los diferentes tipos de trigo en cuanto a movilidad electroforética e intensidad, siendo similares entre sí los perfiles proteicos de las variedades de *T. monococcum*.

Dentro de la especie *T. monococcum*, la distribución de pesos moleculares se localizó entre 250 y 20 KDa. Se caracterizan por una serie de bandas situadas a 250, 150, 100 y 20 KDa respectivamente. También podemos observar bandas en el intervalo de 75 y 50 KDa y un conjunto de bandas con mayor intensidad en torno a los 37 KDa, estas últimas presentes también en el perfil proteico de la gliadina patrón. Existen algunas bandas que no se encuentran presentes en todas las variedades, como las bandas localizadas a 250, 150 y 100 KDa que se

observan en todas las variedades menos en TM6 y TM7. Por tanto, lo que diferencia a unas variedades de otras es la localización de determinadas bandas y su intensidad.

Con respecto a las especies *T. aestivum*, *T. durum* y *Tritordeum*, la distribución de pesos moleculares se localizó entre 250 y alrededor de los 37 KD. Se caracterizan por una serie de bandas situadas a 250 KD, en el intervalo de 75 y 50 KD y un conjunto de bandas con mayor intensidad en torno a los 37 KD, estas últimas presentes también en el perfil proteico de la gliadina patrón.

Estos resultados indican la presencia de distintas subunidades de prolaminas en cuanto a su tamaño en las muestras de trigos objeto de estudio.



**Figura 8.** Geles SDS-PAGE al 12,5% de poliacrilamida teñidos con azul coomasie de *T. monococcum* (TM1-TM7), *T. aestivum* (Jerezano y Anza), *T. durum* (Simeto) y *Tritordeum*. Se caracterizan las prolaminas por el patrón de pesos moleculares (patrón PM) y se compara con la gliadina pura (G).

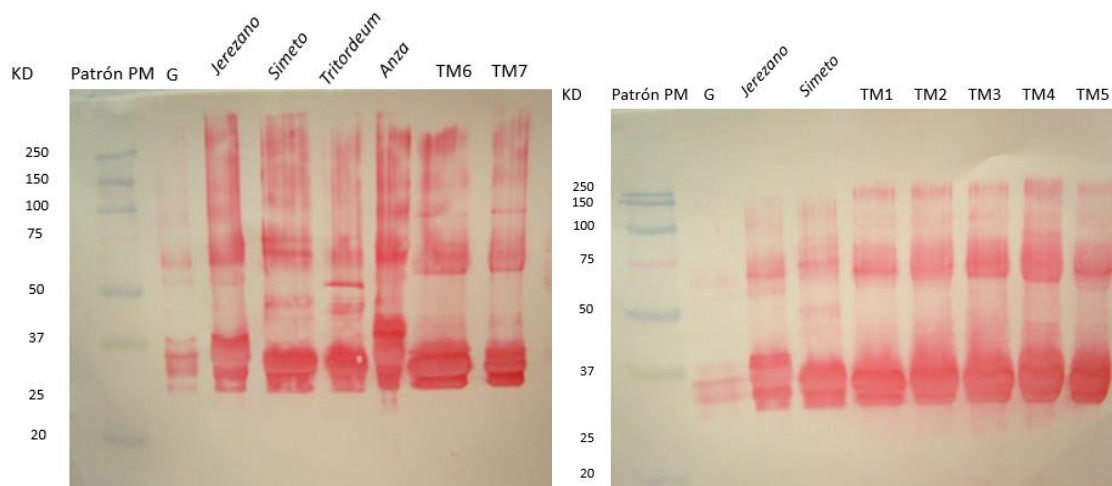
#### 4.3. Estudio de la afinidad relativa del anticuerpo G12 por los distintos tipos de trigos mediante Western Blot

El anticuerpo G12 es específico frente al péptido 33-mer, que contiene 6 epítomos de reconocimiento de las células T y es uno de los péptidos más inmunogénicos presentes en las gliadinas y responsable de la reacción inmune que se desencadena en el intestino de los pacientes celíacos (Shan y cols., 2002, Sollid, 2002).

Para determinar la diferente afinidad del anticuerpo por los distintos tipos de trigos, se utilizó el análisis mediante Western Blot. Así se puede observar como los perfiles proteicos varían entre ellos en cuanto a intensidad y tamaño de proteínas (**Figura 9**).

Las fracciones proteicas de las variedades de *T. monococcum* son similares entre sí y se caracterizan por una banda a 250 y otra a 100 KDa, además de un conjunto de ellas en el intervalo de 75 y 50 KDa y otro conjunto localizado entre 37 y 25 KDa, estos dos últimos también están presentes en el perfil proteico de la gliadina pura. Comparándolo con el gel, no aparecen las bandas a 150 y 20 KDa y en el caso de la membrana, TM6 y TM7 presentan bandas a 250 y 100 KDa. Todas las demás bandas se mantienen.

Por otro lado, las especies *T. aestivum*, *T. durum* y *Tritordeum* presentan fracciones proteicas similares entre sí con conjuntos de bandas entre 75 y 50 KDa y en el intervalo de 37 a 25 KDa, también presentes en el perfil proteico de la gliadina pura. En *T. durum* y *Tritordeum* se puede visualizar una banda característica a 50 KDa. A diferencia del gel, no se observa la banda a 250 KDa y *T. durum* y *Tritordeum* presentan una banda a 50 KDa. Todas las demás bandas se mantienen.



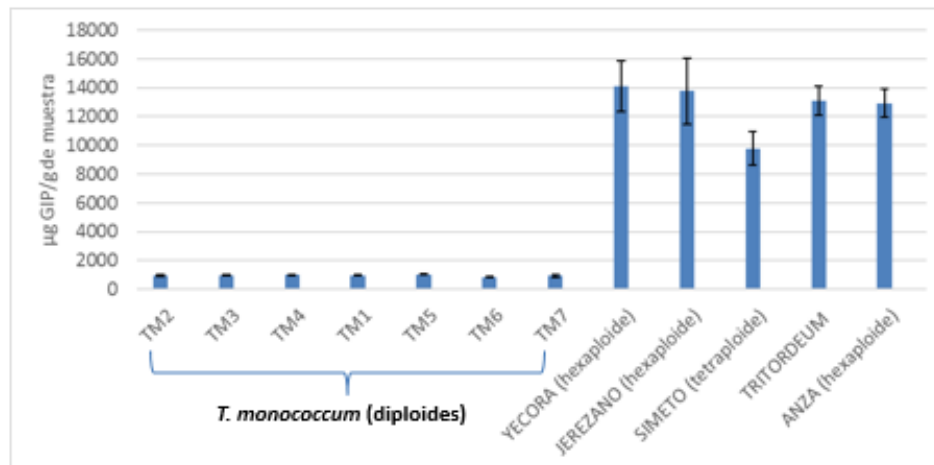
**Figura 9. Western Blot de las prolaminas de *T. monococcum* (TM1-TM7), *T. aestivum* (Jerezano y Anza), *T.durum* (Simeto) y *Tritordeum*. Se caracterizan las prolaminas por el patrón de pesos moleculares (patrón PM) y se compara con la gliadina pura (G).**

#### 4.4. Determinación de la concentración de gluten y de péptidos inmunogénicos presentes en los tipos de trigos mediante ELISA

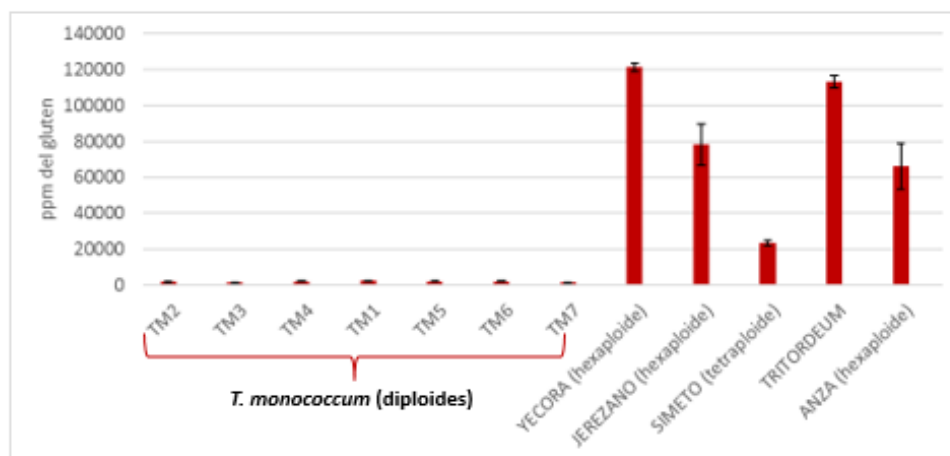
La presencia de péptidos inmunoreactivos fue determinada mediante ELISA, utilizando el anticuerpo G12 conjugado con peroxidasa (G12-HRP). Se realizó dos análisis, uno frente a una curva del péptido 33-mer ya que es uno de los péptidos más inmunogénicos del gluten, y otra frente a una curva de gliadina para determinar la concentración total de gluten.

Esto nos permitió obtener dos medidas del contenido de gluten de las distintas especies de trigo objeto de estudio, bien como gluten total (ppm) o como GIP ( $\mu\text{g}$  GIP/g de muestra) tal y como se muestra en la **Figura 10**.

**A**



**B**



**Figura 10. Determinación del péptido 33-mer (A) y gluten total (B) mediante la técnica ELISA utilizando el anticuerpo G12-HRP de *T. monococcum* (TM1-TM7), *T. aestivum* (Yecora, Jerezano y Anza), *T. durum* (Simeto) y *Tritordeum*.**

Se puede comprobar como los trigos hexaploides (*T. aestivum*), el trigo tetraploide (*T. durum*) y *Tritordeum* tienen un valor mayor de gluten y de GIP en comparación como los trigos diploides (*T. monococcum*). Por lo tanto, una mayor inmunotoxicidad de los trigos tetraploides y hexaploides en comparación con los trigos diploides. Este hecho coincide con otros estudios

como el de Pizzuti y cols. publicado en 2006 que muestra mediante cultivos *in vitro* la menor toxicidad de *T. monococcum* en el intestino ya que no se observan los cambios morfológicos, la sobreexpresión de HLA y la proliferación de LIE típicos de la EC.

Entre las variedades de *T. monococcum*, el valor de la concentración de gluten se encuentra entre 1500 y 2300 ppm. Sin embargo, los valores de *T. durum* (Simeto), *T. aestivum* (Anza), *T. aestivum* (Jerezano), *Triticum* y *T. aestivum* (Yecora) son muy superiores a los trigos diploides, del orden de 10, 30, 40, 55 y 60 veces más que *T. monococcum* respectivamente. Por otro lado, la concentración de GIP de *T. monococcum* está dentro del intervalo de 850 y 1000 µg GIP/g de muestra, mientras que *T. durum* (Simeto), *T. aestivum* (Anza), *T. aestivum* (Jerezano), *Triticum* y *T. aestivum* (Yecora) presentan una concentración de GIP del orden de 10 o incluso 15 veces más que los trigos diploides. Con estos resultados obtenidos podemos deducir que el contenido de gluten tóxico está relacionado con la aploidía de la especie, de manera que los hexaploides presentan un mayor contenido, seguidos de los tetraploides y por último los diploides.

Centrándonos en las variedades de *T. monococcum*, no presentan muchas diferencias en cuanto a la concentración de GIP, siendo las diferencias más significativas entre una variedad y otra con respecto a la concentración de gluten. La variedad TM7 presenta el mayor contenido de prolaminas según el ensayo BCA, mientras que en este caso es la variedad TM1 la que tiene el contenido más elevado de gluten y TM5 el contenido más elevado de GIP.

Estos resultados indican la gran diferencia que existe entre unas especies y otras, en cuanto a la presencia de secuencias inmunotóxicas para el paciente celíaco y cantidad total de gluten. Estas diferencias pueden ser la base de que *T. monococcum* sea más seguro para los celíacos que *T. aestivum*, *T. durum* y *Triticum*, pudiendo ser empleada como alternativa para la EC. Existen estudios en los que se buscan nuevas estrategias para la EC y se compara la toxicidad de los péptidos de gliadina de *T. monococcum* y *T. aestivum*. En 2012, Gianfrani y cols. concluyeron que ambos tipos de trigo inducen la respuesta inmune, siendo esta inducción inferior en *T. monococcum*. Por otro lado, Iacomino y cols. estudiaron en 2016 los efectos biológicos de *T. monococcum* y *T. aestivum* y comprobaron que la especie diploide no provocaba el aumento de la permeabilidad ni la citotoxicidad mientras que la especie hexaploide sí. Incluso, *T. monococcum* tenía cierto efecto protector sobre las células del intestino, reduciendo el daño provocado por *T. aestivum*. Todas estas investigaciones, junto con este trabajo, pueden servir como evidencia para que el uso de *T. monococcum* en alimentos aptos para los pacientes celíacos pueda ser una realidad práctica.

## 5. CONCLUSIONES

---

1. La concentración de prolaminas de *T. monococcum* es similar a la de los demás trigos, exceptuando *T. aestivum* (Anza) cuyo contenido es inferior a la especie diploide. La variedad TM7 de *T. monococcum* fue la que presentó una mayor concentración de prolaminas.
2. Existe una variabilidad de perfiles proteicos entre los distintos tipos de trigos en cuanto a la intensidad y localización de determinadas bandas, lo que indica la existencia de subunidades de prolaminas distintas entre las especies objeto de estudio. En el estudio de la afinidad relativa por el anticuerpo G12 mediante el método Western Blot se observó que las fracciones proteicas de las especies de trigos eran diferentes entre sí.
3. El contenido de gluten tóxico está relacionado con la aploidía de las especies de trigo, de manera que los hexaploides presentan un mayor contenido, seguidos de los tetraploides y por último los diploides.
4. La especie *T. monococcum* fue la que presentó los niveles más bajos tanto de gluten tóxico como de GIP. Estas diferencias pueden ser la base para que *T. monococcum* sea más seguro para los celíacos que *T. aestivum*, *T. durum* y *Tritordeum*, pudiendo ser empleada como alternativa para la producción de alimentos aptos para los celíacos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- **Alaedini A, Green PHR.** Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Int Med.* 2005; 142: 289-299.
- **Arranz E, Garrote JA.** Enfermedad celíaca: introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca. 2ª ed. Madrid: Ergon; 2011.
- **Brandtzaeg P.** The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett.* 2006; 105: 127-139.
- **Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Perdomenico R et al.** The coeliac iceberg in Italy. A multicentre anti gliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl.* 1996; 85: 29-35.
- **Catassi C, Doloretta Macis M, Ratsch IM, De Virgiliis S, Cucca F.** The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue Antigens.* 2001; 58: 402-406.
- **Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R et al.** Why is coeliac disease endemic in the people of Sahara? *Lancet.* 1999; 354: 647-648.
- **Chirido FG, Garrote JA, Arranz E.** Enfermedad celíaca. Nuevas perspectivas terapéuticas basadas en un mejor conocimiento de su patogenia molecular. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2005; 35: 183-189.
- **Cornell HJ, Townley RRW.** Investigation of possible peptidase deficiency in coeliac disease. *Clin Chim Acta.* 1973; 43: 113.
- **Daum S, Cellier C, Mulder CJ.** Refractory coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005; 19: 413-424.
- **Dorn SD, Matchar DB.** Cost-effectiveness analysis of strategies for diagnosing celiac disease. *Dig Dis Sci.* 2008; 53: 680-688.
- **Dvorak J, Deal KR, Luo MC, You FM, von Borstel K, Dehghani H.** The origin of spelt and free-threshing hexaploid wheat. *J Hered.* 2012; 103: 426-441.
- **Eiras P, León F, Camarero C, Roy G.** Los linfocitos intraepiteliales en el diagnóstico de la enfermedad celíaca latente-funcional. *Rev Clín Esp.* 2002; 202: 497-499.
- **Fleckenstein B, Qiao SW, Larsen MR, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM.** Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *Biol Chem.* 2004; 279: 17607-17616.

- **Francesc Casellas i Jordà.** Medicina clínica (revista). Elsevier. Vol. 126. Núm. 04. 2006. Servicio de Digestivo. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona. España. [Consultado en mayo 2016]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-articulo-enfermedad-celiaca-13084031>
- **García-Molina MD, García-Olmo J, Berro F.** Effective identification of low-gliadin wheat lines by near infrared spectroscopy (NIRS): implications for the development and analysis of foodstuffs suitable for celiac patients. Research Article. 2016. doi: 10.1371
- **Gianfrani C, Maglio M, Rotondi A, Aufiero V, Camarca A, Vocca I, Iaquinio G et al.** Immunogenicity of monococcum wheat in celiac patients. Am J Clin Nutr. 2012; 96: 1339-1345.
- **Gil-Humanes J, Pistón F, Barro F, Rosell CM.** The shutdown of celiac disease-related gliadin epitopes in bread wheat by RNAi provides flours with increased stability and better tolerance to over-mixing. Research Article. 2014. doi: 10.1371
- **Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M et al.** The first large population based twin study of coeliac disease. Gut. 2002; 50: 624-628.
- **Gregorio JM.** Enfermedad celíaca: diagnóstico y su tratamiento. 2011. [Consultado en mayo 2016]. Disponible en: <https://drjuanmanuelgregorio.wordpress.com/2011/06/12/enfermedad-celiaca-diagnostico-y-su-tratamiento/>
- **Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, Hoffenberg EJ et al.** Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. J Ped Gastroenterol. 2005; 40: 1-19.
- **Iacomino G, Di Stasio L, Fierro O, Picariello G, Venezia A, Gazza L et al.** Protective effects of ID331 *Triticum monococcum* gliadin on in vitro models of the intestinal epithelium. Food Chem. 2016; 212: 537-542.
- **Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L et al.** Epidemic of coeliac disease in swedish children. Acta Pediatr. 2000; 89: 165-171.
- **Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S et al.** Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. Lancet. 2003; 362: 30-37.
- **Matsouka Y.** Evolution of polyploid triticum wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. Plant Cell Physiol. 2011; 52: 750-764.



- **Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martínez T et al.** Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterol.* 2005; 129: 786-796.
- **Mulder CJ, Cellier C.** Coeliac disease: changing views. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005; 19: 313-321.
- **Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid M et al.** Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferón gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterol.* 1998; 115: 551-563.
- **Ohteki T, Suzue K, Maki C, Ota T, Koyasu S.** Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nat Immunol.* 2001; 2: 1138-1143.
- **Pinto-Sánchez MI, Verdu EF, Liu E, Bercik P, Green PH, Murray JA et al.** Gluten introduction to infant feeding and risk of celiac disease: systematic review and meta-analysis. *J Pediatr.* 2016; 168: 132-143.
- **Pizzuti D, Buda A, D'Odorico A, D'Inca R, Chiarelli S, Curioni A et al.** Lack of intestinal mucosal toxicity of *Triticum monococcum* in celiac disease patients. *Gastroenterol.* 2006; 41: 1305-1311.
- **Polanco I.** Enfermedad celíaca: un reto diagnóstico. *Pediátrika.* Madrid: Alpe Editores; 2005.
- **Real A.** Determinación del potencial inmunotóxico de la avena: selección de variedades aptas para pacientes celíacos. Trabajo Fin de Máster. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Sevilla; 2010.
- **Rostami Nejad M, Ishaq S, Al Dulaimi D, Zali MR, Rostami K.** The role of infectious mediators and gut microbiome in the pathogenesis of celiac disease. *Arch Iran Med.* 2015; 18: 244-249.
- **Roy A, Laszkowska M, Sundström J, Lebwohl B, Green P, Kämpe O et al.** Prevalence of celiac disease in patients with autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *Thyroid.* 2016; 26: 880-890.
- **Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA.** ACG Clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2013; 108: 656-676.
- **Sander GR, Cummins AG, Henshall T, Powell BC.** Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett.* 2005; 579: 4851-4855.

- **Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM et al.** Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002;297: 2275-2279.
- **Sollid LM.** Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 647-655.
- **Spaenij-Dekking L, Kooy-Winkelaar Y, van Veelen P, Drijfhout JW, Jonker H, van Soest L et al.** Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. Potential for selection and breeding of non-toxic wheat varieties. *Gastroenterol*. 2005; 129: 797-806.
- **Stern M, Ciclitira PJ, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Méndez E et al.** Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 13: 741-747.
- **Vici G, Belli L, Biondi M, Polzonetti V.** Gluten free diet and nutrient deficiencies. Review. *Clin Nutr*. 2016. doi 10.1016
- **Wieser H.** The precipitating factor in celiac-disease. *Baillieres Clin. Gastroenterol*. 1995; 9: 191-207.
- **Zanini B, Petroboni B, Not T, Di Toro N, Villanacci V, Lanzarotto F et al.** Search for atoxic cereals: a single blind, cross-over study on the safety of a single dose of *Triticum monococcum*, in patients with celiac disease. *BCM Gastroenterol*. 2013; 13: 92.
- <https://paniquesillo.wordpress.com/2014/04/22/trigos-nuevos-trigos-salvajes-i-origen/>



